Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 747-759

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۷۵۹ -۷۴۷

مقاله پژوهشی

اثر تخمیر بوسیله دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کینوا

رعنا طهماسبی[۱]- مهتا میرزایی[۲*]- محمدرضا خانی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده

فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های تخمیرکننده می‌تواند منجر به تولید پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدفشارخون، ضددیابت و غیره گردد. در این پژوهش اثر تخمیر بوسیله دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب دو باکتری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کینوا در زمان‌های مختلف تخمیر بررسی گردید. فرآیند تخمیر با تلقیح میکروارگانیسم‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت جداگانه و ترکیبی به عصاره آبی کینوا آغاز و در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲، ساعت نمونه‌برداری انجام شد. سپس فاکتورهایی از قبیل pH، اسیدیته، میزان پروتئین محلول، میزان هیدرولیز، میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با روش مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توان اسیدسازی بیشتری در مقایسه با *لاکتوباسیلوس روتری* دارد. به‌طوریکه میزان اسیدیته در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ۷۲ ساعت از ۰/۲۷ به ۱/۱۳ درصد رسید در حالیکه این مقدار در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* ۰/۸۰ درصد اندازه‌گیری شد. درجه هیدرولیز در نمونه‌های تخمیر شده توسط تمام گونه‌ها افزایش یافت و بیشترین افزایش مربوط به نمونه تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بود به‌طوری که میزان گروه‌های آمین آزاد از ۲۰/۲۸ به ۵۸/۱۴ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین در طی ۷۲ ساعت تخمیر رسید. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در تمامی نمونه‌های تخمیری افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتو باسیلوس روتری*، ترکیب دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (با نسبت ۵۰:۵۰) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده شد. میزان ترکیبات فنولی در تمامی نمونه‌های تخمیر شده افزایش یافت. اما بیشترین افزایش مربوط به نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* بود که بعد از ۷۲ ساعت فرآیند تخمیر از ۰/۷۳ به ۱۶/۲۱ میلی‌گرم اسیدگالیک/ میلی‌لیتر رسید. در نهایت نتایج این تحقیق نشان دادند که تخمیر عصاره کینوا باعث بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود و محصول تولیدی دارای پتانسیل کاربرد به‌عنوان نوشیدنی تخمیری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تخمیر، عصاره کینوا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

مقدمه

رشد فزآینده بیماری‌ها در زندگی معمول نظیر انفارکتوس میوکارد، اختلالات قلبی عروقی، سکته مغزی، فشار خون بالا، دیابت و غیره به‌عنوان یک نگرانی جدی جهانی تلقی شده است (Saadi *et al.*, 2015). مجموعه‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی، از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدفشارخون، ضددیابت و تقویت سیستم ایمنی بدن به انواع مختلف پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع غذایی مختلف نسبت داده شده است. این پپتیدها با روش‌های مختلفی نظیر سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می‌شوند (Mirzaei *et al.*, 2018).

توسعه محصولات غذایی جدید با بهبود کیفیت و مزایای سلامت بخشی در سال‌های اخیر مورد توجه واقع شده است (Dallagnol *et al.*, 2013). امروزه افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به رژیم‌های سالم و تغییر عادات غذایی به‌دلیل شهرنشینی باعث شده است که بازارهای بزرگ غذایی، برای تولید غذاهای کاربردی جدید با تأثیر مفید بر سلامتی ایجاد شود (Rathore *et al.*, 2012). در همین راستا، علاقه زیادی به استفاده از شبه غلات مانند کینوا برای فرمولاسیون غذاهای جدید ایجاد شده است. دانه کینوا به‌دلیل ترکیب متعادل اسید آمینه‌های ضروری، منبع عالی از پروتئین‌های با کیفیت محسوب می‌شود (Wright *et al.*, 2002). پروتئین‌های موجود در رژیم غذایی به‌طور معمول به‌عنوان منبع انرژی و آمینواسیدهای ضروری در نظر گرفته

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mahtam86@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i5.88370

می‌شوند که جهت رشد و حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی مورد نیاز هستند اما در سال‌های اخیر نقش پروتئین‌های غذایی به‌عنوان ترکیبات مهم فیزیولوژیکی مورد استقبال قرار گرفته است (موئدی و همکاران، ۱۳۹۶). فرآیند تخمیر به‌عنوان یکی از موثرترین روش‌ها، برای افزایش ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی و سلامت بخشی تلقی می‌شود. فرآیند تخمیر باعث بهبود محتوای مواد مغذی غذاها از طریق بیوسنتز ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و پروتئین‌های ضروری می‌گردد و باعث افزایش فراهمی زیستی ریز مغذی‌ها و با تخریب عوامل ضدتغذیه‌ای می‌شود (Magala *et al.*, 2015). اثرات سلامت بخشی باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله خواص ضدمیکروبی، ضدسرطان و... توجه محققین مختلف را در صنایع غذایی و داروسازی به‌خود جلب کرده است (میردامادی و همکاران، ۱۳۹۶). هیدرولیز پروتئین‌های کینوا توسط باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند رشد و فعالیت متابولیکی آنها را در انتشار اسیدهای آلی، پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه افزایش دهد (Dallagnol *et al.*, 2013). براین اساس پپتیدهای تولید شده در طی فرآیند تخمیر می‌توانند خواص متعددی من جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدفشار خون و... داشته باشند. خواص پپتیدهای زیست فعال به ترکیب و توالی آن‌ها بستگی دارد (Kim *et al.*, 2013). در طی جریان تخمیر علاوه بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان ترکیبات فنولی نیز تولید می‌شود که این ترکیبات نیز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات به دلیل خاصیت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌ها می‌باشد. آنها به‌عنوان احیاکننده، دهنده هیدروژن و شلاته‌کننده فلزات عمل می‌کنند (جمشیدی و همکاران، ۱۳۸۹، Chung و همکاران، ۲۰۰۲). از آنجایی که اکسیداسیون یک عامل مهم در بروز بیماری‌های مختلف در انسان و کاهش عمر محصولات غذایی است (Sharma *et al.*, 2011)، بنابراین تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان به عنوان نسل جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده است (Wang *et al.*, 2017). در تحقیق حاضر اثر تخمیر بوسیله دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کینوا مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کینوا از بازار محلی تهیه شد، باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* (PTCC NO:۱۶۵۵) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC ۱۶۴۳ NO:) از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران، محیط کشت MRS BROTH و MRS AGAR ‎۲-۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH[1])، ۲و ۲ آزینو بیس ۳-اتیل بنزوتیازولین -۶ سولفونیک اسید (ABTS[2]) از شرکت سیگما (آمریکا) و سرم آلبومین گاوی (BSA[3])، لوسین، ارتوفتال آلدئید (OPA[4])، سولفات مس، سدیم تترا بورهیدرات، سود سوزآور، معرف فولین و سدیم پتاسیم تارتارات از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

روش تهیه مایه تلقیح

باکتری‌ها از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران تهیه شد و بعد از احیاء در محیط MRS، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها برای تولید مایه تلقیح استفاده شد (خلیلی و ارجائی، ۱۳۹۷).

تهیه عصاره کینوا

برای تهیه عصاره کینوا، ابتدا دانه‌های کینوا تمیز شد و سپس در آب با دمای محیط همزده و شسته شدند چندین بار آب آن تعویض شد. آب مورد استفاده به نسبت ۱۸ به ۱ به دانه‌های کینوا اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه عمل پخت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس هموژناسیون و بعد فیلتراسیون انجام شد. سپس عصاره آبی کینوا توسط صافی از دانه‌های کینوا جدا شد. قسمت صاف شده در۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه استریل گردید و تا دمای محیط سرد شد تا عصاره‌ها آماده تلقیح باکتری گردند (Bianchi *et al.*, 2015).

تلقیح باکتری‌ها به عصاره کینوا

فرآیند تخمیر با تلقیح میکروارگانیسم‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت جداگانه و ترکیبی به صورت هم زمان به عصاره آبی کینوا آغاز شد. نمونه لیوفیلیزه باکتری‌ها در محیط کشت MRS Broth کشت داده شدند و در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. کشت ۲۴ ساعته از باکتری‌ها بعد از بررسی عدم وجود آلودگی و خلوص باکتری‌ها، برای تهیه مایه تلقیح استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت اولیه به ۱۰ سی‌سی محیط کشت MRS تلقیح شد. حجم مورد استفاده از سوسپانسیون مایه تلقیح برای به رسیدن به جمعیت نهایی 10^7 cfu/ml از میگروارگانیسم‌ها در محصول محاسبه و به نمونه مورد نظر تلقیح شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت تخمیر گرمخانه‌گذاری و در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری انجام و جهت توقف فرآیند تخمیر، محصول تا دمای یخچال سرد و تا

1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2 2,2- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
3 Bovine serum albumin
4 O-phthaldialdehyde

انجام کامل آزمون‌ها در یخچال نگهداری شد (ابراهیمی‌جم و همکاران، ۱۳۹۸).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

محتـوی تـام فنولیک با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیـری شد. به نمونه‌ها با غلظت (۱۰میلـی‌گـرم بـر میلـی‌لیتر) واکنشگر فـولین سـیوکالتیو رقیق شده با نسبت ۱:۵ اضافه شد، پس از ۳ دقیقه، محلول کربنات سـدیم ۷/۵ درصد بـه آن اضـافه شد. مخلـوط ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد سپس در طـول مـوج ۷۶۰ نـانومتر توسـط دسـتگاه اسپکتوفوتومتر (PG Instruments، Merck آلمان) خوانده شد. میزان ترکیبات فنولی براساس استاندارد کالیبراسیون اسیدگالیک و برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک گزارش شد (ساده میری نژاد و همکاران، ۱۳۹۴).

اندازه‌گیری پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در نمونه‌های مورد آزمون، از روش لوری استفاده شد. در روش لوری، محلول A از ترکیب سولفات مس (۱ درصد)، سدیم پتاسیم تارتارات (۲ درصد)، سود ۰/۱ نرمال و کربنات سدیم ۲ درصد تهیه شدند. در زمان آزمایش، مقدار مشخصی نمونه پروتئینی با محلول A مخلوط و بلافاصله ورتکس و ۱۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس محلول فولین رقیق شده (به نسبت ۱:۱ با آب) به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد BSA و بر حسب mg/ml گزارش شد. ابتدا رقت‌های مختلف (۲۰۰ -صفر میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تهیه و با استفاده از روش لوری میزان پروتئین محلول محاسبه گردید (Lowry *et al.*, 1951).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز به روش OPA

محلول ارتو فتال آلدئید از مخلوط سدیم تترا هیدرابورات (۱۰۰ میلی‌مولار)، سدیم دسیل سولفات (۲۰ درصد)، ارتوفتال آلدئید در متانول و بتامرکاپتواتانول به صورت تازه تهیه شد. در زمان آزمایش، مقدار مشخصی نمونه پروتئینی با محلول ارتو فتال آلدئید تهیه شده مخلوط شد و بلافاصله ورتکس و ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به میزان مشخص آب مقطر اضافه شد و جذب نمونه‌ها در ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد لوسین مقدار گروه‌های آمین آزاد براساس میکرومول لوسین بازای میلی گرم پروتئین گزارش شد (Fitznar *et al*., 1999).

تعیین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت ضداکسایشی با استفاده از روش مهار رادیکال DPPH

برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH، میزان مشخصی از هر نمونه (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با محلول DPPH ۰/۰۰۲ درصد در اتانول مخلوط شد. سپس مخلوط واکنش در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس کاهش جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH بر اساس فرمول زیر و به ازاء وزن مشخصی از پروتئین گزارش شد (Abugoch *et al.*, 2009).

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال } (\%) = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100 \qquad (۱)$$

ارزیابی فعالیت ضداکسایشی با استفاده از روش مهار رادیکال ABTS

محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی‌مولار) مخلوط و در دمای یخچال برای مدت ۱۶-۱۷ ساعت، نگهداری شد. محلول سبز آبی با بافر فسفات (۵ میلی مولار، pH=۷) تا رسیدن به میزان جذب ۰/۰۲±۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. مقدار مشخصی از نمونه با معرف ABTS مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS بر اساس فرمول زیر و به ازاء وزن مشخص از پروتئین گزارش شد (Re *et al.*, 1999).

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال } (\%) = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100 \qquad (۲)$$

اندازه‌گیری pH و اسیدیته قابل تیتر

pH عصاره تخمیری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه pHمتر (C863, Consort، دانمارک) اندازه‌گیری شد. اسیدیته قابل تیتر با استفاده از روش تیتراسیون و به صورت درصد اسید لاکتیک بیان شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (استاندارد ملی ایران۱۱۱۱۷، ۱۳۸۶).

$$\text{اسیدیته } \left(\text{درصد}\right) = \frac{2 \times \text{حجم سود مصرفی} \times 0.009 \times 100}{\text{وزن نمونه}} \qquad (۳)$$

بررسی زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها

برای شمارش سلول‌های زنده باکتری‌ها (*لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) از کشت سطحی در پلیت‌های حاوی

محیط کشت MRS آگار استفاده شد. نتایج به صورت واحد لگاریتمی تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر بیان شد (خلیلی و ارجائی، ۱۳۹۷).

$$\text{شمارش سلول زنده} = \frac{\text{مجموع کلنی‌های شمارش شده}}{\text{ضریب رقت} \times \text{حجم تلقیح شده در پلیت}} \qquad (۴)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شدند. رسم نمودارها و آنالیز آماری با روش تجزیه واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها توسط تست Turkeys multiple و به کمک نرم‌افزار graphpad prism 8 انجام شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد.

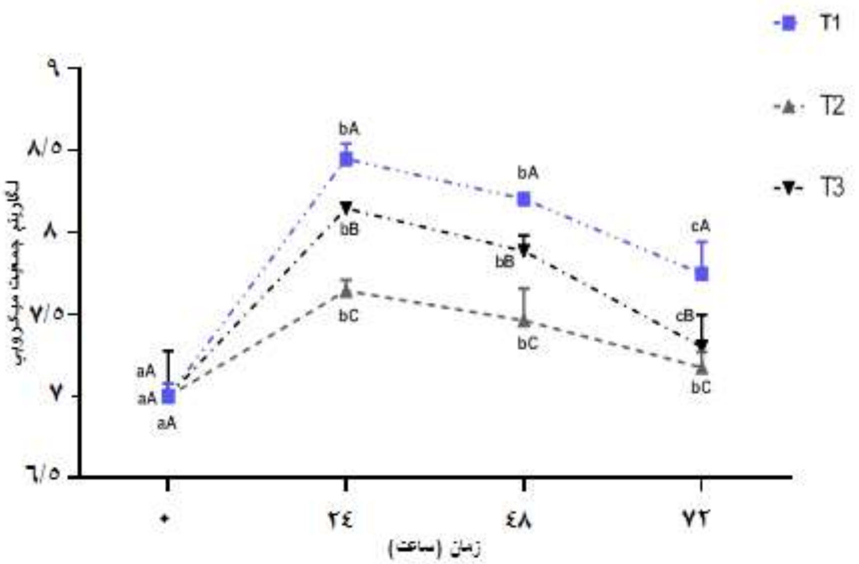
نتایج و بحث

خواص فیزیکوشیمیایی آرد حاصل از دانه کینوا

میزان پروتئین کل آرد دانه کینوا اندازه‌گیری شده با روش کلدال ۱۳/۴۹ درصد بازای وزن خشک نمونه برآورد شد. در تحقیق مشابهی که Sezgin و Sanlier (۲۰۱۹) انجام دادند میزان پروتئین کل دانه کینوا را ۱۴/۱۲ درصد بازای وزن خشک کینوا گزارش کردند. میزان pH آرد دانه کینوا نیز ۶/۲۴ و میزان اسیدیته آرد ۱/۰۴ درصد اندازه‌گیری شد.

بررسی رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طی تخمیر

نتایج مربوط به رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در عصاره کینوا تهیه شده در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل۱ - ارزیابی زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس روتری (T1)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T2) و لاکتوباسیلوس روتری+ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T3) در طی تخمیر در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت

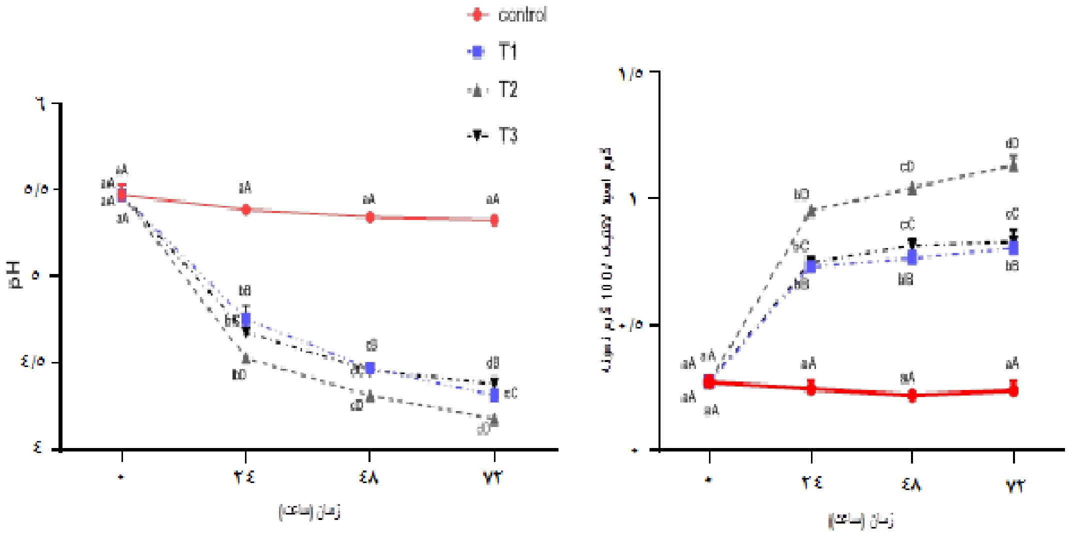
حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* پس از ۲۴ ساعت تخمیر افزایش یافت و از ۷ به ۸/۴۴ Log CFU/ml رسید. سپس با ادامه فرآیند تخمیر تا ۴۸ و ۷۲ ساعت تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* به‌ترتیب به ۸/۲۰ و ۷/۷۸ Log CFU/ml کاهش یافت. از طرف دیگر تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ۲۴ ساعت اول نیز با افزایش همراه بود و به ۷/۶۴ Log CFU /ml رسید. سپس در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب به ۷/۴۶ و ۷/۱۷ Log CFU/ml کاهش یافت. ولی این تغییرات معنادار نبود ($p>0.05$). نتایج مربوط به شکل ۱ تیمار (T3) نشان دادند که زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* زمانی که به‌صورت ترکیبی در نوشیدنی تخمیری استفاده شدند در طی ۲۴ ساعت اول فرآیند تخمیر افزایش یافت و به ۸/۱۴ Log CFU/ml رسید. اما در ۲۴ ساعت دوم فرآیند تخمیر با کاهش همراه بود ولی این تغییرات معنادار نبود ($p>0.05$). سپس تعداد باکتری‌های پس از ۷۲ ساعت روند کاهشی یافت و به ۷/۳۰ Log CFU/ml رسید. در میان این باکتری‌ها، رشد باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* نسبت به سایر باکتری‌ها بیشتر بود. که این تفاوت در رشد باکتری‌ها مربوط به خصوصیات ساختاری باکتری

می‌باشد. علاوه بر آن نتایج نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر تا ۲۴ ساعت جمعیت باکتری‌ها افزایش یافت ولی با ادامه فرآیند تخمیر تا ۷۲ ساعت از جمعیت باکتری‌ها در تمامی نمونه‌ها کاسته شد. محقق دلیل این امر را اینگونه بیان کردند که با افزایش زمان تخمیر و کاهش مواد مغذی از یک طرف و تولید اسید و کاهش pH از طرف دیگر زنده‌مانی این باکتری‌ها کاهش می‌یابد. یکی دیگر از عواملی که تاثیر بسزایی در زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک دارد حضور اکسیژن و گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد که سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و ترکیبات سمی می‌شود که این ترکیبات برای باکتری‌های پروبیوتیک خطرناک هستند و سبب از بین رفتن آن‌ها می‌شود (سوری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Bianchi *et al.*, 2015; Ceballos-González *et al.*, 2018).

اثر تخمیر بر pH و اسیدیته

در مرحله دوم اثر تخمیر بر pH و اسیدیته نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در شکل ۲ ارائه شده است.



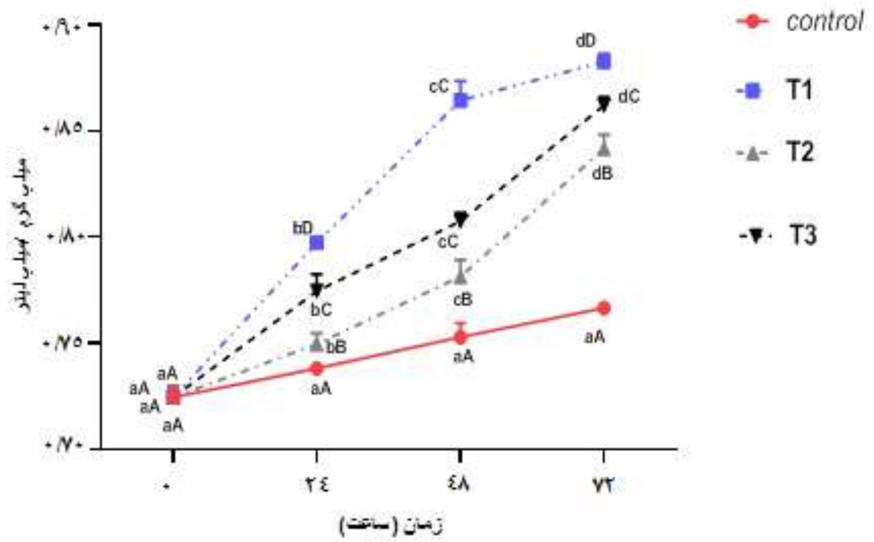
شکل ۲- بررسی اثر تخمیر بر pH و اسیدیته نمونه‌های کینوا حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس روتری (T1)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T2) و لاکتوباسیلوس روتری+ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T3) در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و مقایسه با نمونه کنترل (تخمیر نشده)
حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

بعد از بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طی فرآیند تخمیر، pH و اسیدیته نمونه‌ها بعنوان دو فاکتور مهم مورد ارزیابی قرار گرفت. براین اساس طبق شکل ۲ میزان pH تمامی نمونه‌های تخمیر شده توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب این دو باکتری با نسبت ۵۰:۵۰ کاهش یافت. به‌طوری که در نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* از ۵/۴۷ در زمان صفر به ۴/۳۲ پس از ۷۲ ساعت تخمیر رسید. میزان pH در نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قبل از فرآیند تخمیر ۵/۴۷ اندازه گیری شد ولی با ادامه تخمیر تا ۷۲ ساعت به ۴/۱۸ رسید و در نمونه تخمیر شده توسط ترکیب این دو باکتری میزان pH از ۵/۴۷ در ابتدا به ۴/۳۸ پس از ۷۲ ساعت تخمیر رسید. نتایج نشان دادند که pH نمونه‌های تخمیر شده در اثر فعالیت بیشتر این باکتری‌ها در طی فرآیند تخمیر به‌طور معناداری کاهش یافته است ($p<0.05$). میزان اسید لاکتیک تولید شده توسط باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان یکی دیگر از فاکتورها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میزان اسیدیته در نمونه تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* از ۰/۲۷ به ۰/۸۰ درصد در طی ۷۲ ساعت تخمیر افزایش یافت. ولی بیشترین افزایش مربوط به ۲۴ ساعت اول فرآیند تخمیر بود. میزان اسیدیته در نمونه حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی فرآیند تخمیر افزایش یافت به‌طوری که از ۰/۲۷ درصد در ابتدای فرآیند به مقادیر ۰/۹۵، ۱/۰۴ و۱/۱۳ درصد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تخمیر رسید. میزان اسیدیته در نمونه حاوی باکتری‌های *لاکتوسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۵۰:۵۰) نیز همانند سایر نمونه‌ها طی فرآیند تخمیر افزایش یافت و از ۰/۲۷ درصد به ۰/۸۳ درصد در زمان‌های آخر تخمیر رسید. نتایج نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سبب افزایش بیشتر اسیدیته نسبت به سایر تیمارها شد بطوری که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارای رشد کمتر و قدرت بالاتر در تولید اسید است در حالی که باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* دارای رشد سریعتر و سرعت تولید اسید کمتری می‌باشد. بنابراین نتایج نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قدرت اسیدسازی بالاتری

دارد در حالی که باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* از قدرت اسیدسازی متوسط برخوردار است. براساس نتایج حاصل از منحنی رشد و تغییرات pH به‌نظر می‌رسد که رشد سریع‌تر باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* نسبت به *باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ۲۴ ساعت اول فرآیند تخمیر توجیه‌کننده عدم کاهش شدید pH در نمونه‌های حاوی سویه‌های ترکیبی (*لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با نسبت ۵۰:۵۰) می‌باشد و بعد از آن با آغاز رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با قدرت اسیدسازی بالاتر، کاهش pH در نمونه‌ها تشدید شده است. باقری و همکاران (۱۳۹۸) در تحقیقی که انجام دادند رشد و میسر متابولیکی باکتری‌ها را عامل تغییرات pH در نمونه‌های تخمیر شده بیان کردند. ایزدی و همکاران (۱۳۹۶) شرایط تولید نوشیدنی تخمیری فراسودمند بر پایه برنج را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت تکی و توام به‌منظور تخمیر استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سبب افزایش اسیدیته نسبت به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شد. آنها دلیل این امر را فعالیت بیشتر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول فرآیند تخمیر بیان داشتند. Akpinar و همکاران (۲۰۱۰) از مهمترین دلایل افزایش میزان اسیدیته و pH در طی فرآیند تخمیر و نگهداری موادغذایی را نیز فعالیت باکتری‌ها و تولید اسید توسط آن‌ها (به خصوص اسید لاکتیک) گزارش کردند (Akpinar *et al.*, 2010) علاوه بر آن محققین مختلف گزارش کردند که باکتری‌های اسید لاکتیک اسید دوست هستند در نتیجه قادر به تحمل pH پایین می‌باشند (Ceballos-González *et al*., 2018; Katina *et al*., 2007).

میزان پروتئین محلول، اندازه‌گیری شده از نوشیدنی تخمیری بر پایه کینوا توسط روش لوری

میزان پروتئین محلول نمونه‌ها با روش لوری اندازه‌گیری شد. براین اساس میزان پروتئین محلول نمونه‌ها قبل و طی زمان‌های مختلف تخمیر اندازه‌گیری شد. نتایج در شکل ۳ ارائه شده است.



شکل ۳- بررسی میزان پروتئین محلول نمونه‌های کینوا حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس روتری (T1)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T2) و لاکتوباسیلوس روتری+ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T3) اندازه‌گیری شده توسط لوری در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و مقایسه با نمونه کنترل (تخمیر نشده)

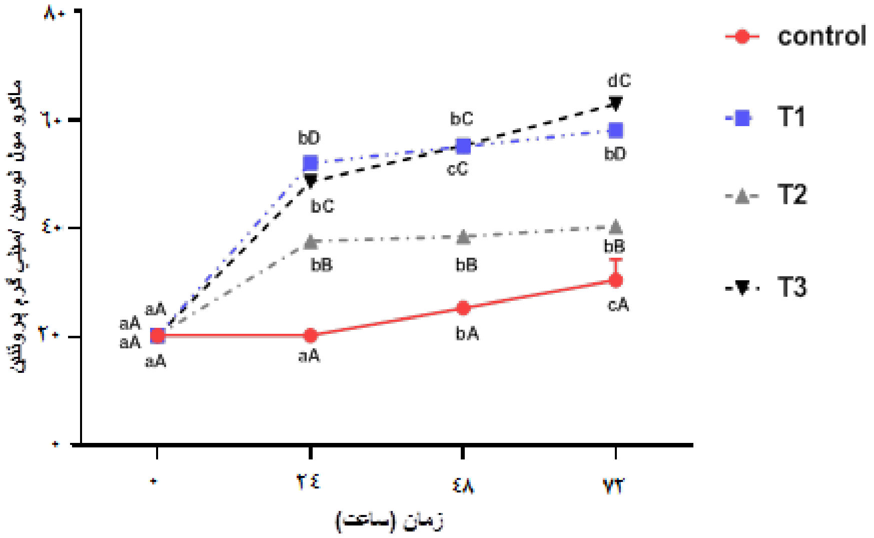
حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، که میزان پروتئین محلول در نمونه کنترل (تخمیر نشده) در طی زمان‌های مختلف تفاوت معناداری را نشان نداد ($p>0.05$) و میزان آن پس از ۷۲ ساعت ۰/۷۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر اندازه گیری شد. غلظت پروتئین محلول در نمونه‌های تخمیر شده توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس* نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس نتایج نشان دادند که غلظت پروتئین محلول در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* چه به‌صورت جداگانه و چه به‌صورت ترکیب باهم (۵۰:۵۰) سبب افزایش میزان پروتئین نسبت به نمونه کنترل (تخمیر نشده) شد. بنابراین میزان

پروتئین محلول به‌ترتیب در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب این دو باکتری ۰/۸۸، ۰/۸۴ و ۰/۸۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت تخمیر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند که میزان پروتئین محلول نمونه‌ها در طی فرآیند تخمیر افزایش یافته است که این مشاهده ممکن است به دلیل تبدیل پروتئین‌ها با ساختار پیچیده به ترکیبات پروتئینی ساده‌تر باشد که باعث شده است مقدار پروتئین بالاتر اندازه‌گیری شود. Zannin و همکاران (۲۰۱۸) نیز اثر تخمیر ماست بر پایه آرد کینوا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد را بر تغییرات pH و اسیدیته مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها نیز گزارش کردند که میزان پروتئین محلول نمونه‌ها در طی فرآیند تخمیر افزایش یافته است و دلیل اصلی افزایش میزان پروتئین محلول را در طی فرآیند تخمیر تغییرات pH و تولید اسید لاکتیک گزارش کردند (Zannini *et al.*, 2018). Ankolekar و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی که بر روی تخمیر گلابی توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* انجام دادند گزارش کردند که میزان پروتئین محلول در طی فرآیند تخمیر افزایش یافته است آن‌ها دلیل تغییرات پروتئین محلول اینگونه بیان داشتند که باکتری‌های اسید لاکتیک به منابع بیرونی نیتروژن وابسته هستند و ترشح پروتئینازهای غیر اختصاصی برای به‌دست آوردن این منبع اگزوژن ازت احتمالاً باعث آزادسازی پپتیدها می‌شود که باعث میزان اندازه‌گیری محتوای پروتئین می‌شود (Ankolekar *et al.*, 2012). Apostolidis و همکاران (۲۰۰۷) اثر تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شیر و شیرسویا را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها از روش برادفورد برای اندازه‌گیری پروتئین محلول استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که میزان پروتئین محلول‌ها در تمامی نمونه‌ها در طی ۲۴ ساعت تخمیر به‌طور معناداری کاهش یافت. به‌طور خاص، میزان پروتئین محلول در شیر و شیر سویای تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس بلگاریکوس* ۴۹٪ و ۱۳٪ کاهش یافته است. مقدار پروتئین در شیر و شیر سویای تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۵۴ درصد و ۷۳ درصد کاهش یافته است. آن‌ها کاهش محتوای پروتئین را اینگونه بیان داشتند که باکتری‌های اسید لاکتیک به شدت وابسته به منابع ازت هستند و نتایج نشانگر آزادسازی پپتیدها از شیر و شیر سویا به دلیل عمل پروتئینازهای غیراختصاصی ترشح شده در زمان تخمیر است. علاوه بر این، کاهش کمتری در غلظت پروتئین محلول در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس بلگاریکوس* مشاهده شد، آن‌ها دلیل این امر را اینگونه بیان داشتند که پروتئین سویا نمی‌تواند به‌طور کامل توسط این سویه باکتریایی خاص مورد استفاده قرار گیرد (Apostolidis *et al.*, 2007).

میزان درجه هیدرولیز نمونه‌های تخمیر شده با روش OPA

میزان گروه‌های آمین آزاد نمونه‌ها توسط روش OPA اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت شکل زیر گزارش شد.



شکل ٤- بررسی میزان گروه‌های آمین آزاد نمونه‌های کینوا حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* (T1)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (T2) و *لاکتوباسیلوس روتری+ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (T3) اندازه گیری شده توسط OPA در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت و مقایسه با نمونه کنترل (تخمیر نشده)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

یکی از روش‌های متداول برای بررسی میزان تولید پپتیدهای زیست فعال فرآیند تخمیر می‌باشد و ارزیابی درجه هیدرولیز براساس میزان گروه‌های آمین آزاد به‌عنوان یک فاکتور مهم برای بررسی پپتیدهای تولید شده در طی فرآیند تخمیر می‌باشد. زیرا در طی فرآیند تخمیر پروتئین‌های کینوا توسط آنزیم‌های خارج از سلولی لاکتوباسیلوس‌ها هیدرولیز می‌شوند (باقری و همکاران، ۱۳۹۸). نتایج ارائه شده در شکل ۴ نشان دادند که میزان درجه هیدرولیز در تمامی نمونه‌ها اعم از تخمیر شده و تخمیر نشده (کنترل) در طی زمان‌های مختلف افزایش یافت. در نمونه کنترل (تخمیر نشده) این میزان گروه‌های آمین آزاد از ۲۰/۲۸ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین در ابتدا به ۳۰/۴۶ میکرو مول لوسین/ میلی گرم پروتئین در ساعت پایانی رسید. میزان گروه‌های آزاد در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* در طی فرآیند تخمیر افزایش یافت و به ۵۸/۱۴ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین پس از ۷۲ ساعت تخمیر رسید. میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز با افزایش همراه بود ولی بیشترین تغییرات مربوط به ۲۴ ساعت اول تخمیر بود و از ۲۰/۲۸ میکرو مول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین در دقایق صفر به ۳۷/۶۷ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین رسید سپس با توقف روند همراه بود. میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه تخمیر شده توسط ترکیبی از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با نسبت ۵۰:۵۰ افزایش یافت به‌طوری که پس از ۷۲ ساعت تخمیر به ۶۳/۰۱ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین رسید. نتایج نشان دادند میزان پروتئولیز در باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بیشتر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. که دلیل این امر را می‌توان به نیاز بیشتر این باکتری به اسیدهای آمینه ضروری مربوط دانست (Griffiths *et al.*, 2013). علاوه بر آن نتایج نشان دادند که میزان پروتئولیز در نمونه تخمیر شده توسط ترکیب دو باکتری کمتر از نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* بود. دلیل این امر را می‌توان رقابت بین دو باکتری در ابتدای فرآیند تخمیر بیان داشت و این عامل می‌تواند دلیل پروتئولیز کمتر در نمونه تخمیر شده حاوی ترکیب دو باکتری را توجیه کند. ولی با ادامه فرآیند تخمیر، پروتئولیز افزایش یافته به‌طوری که تفاوت معناداری با نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* مشاهده نشده است. محققین مختلف دلیل افزایش میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های تخمیری را آنزیم‌های پروتئاز موجود در میکروارگانیسم‌های زنده بیان داشتند که سبب تولید پپتیدهای زیست فعال در طی فرآیند تخمیر می‌شوند (Chen *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2005).

در تحقیقی که Pérez-Escalante و همکاران (۲۰۱۸) انجام دادند اثر تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بر فعالیت ضدترومبوتیک پروتئین شیر را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که بعد از ۱۰ ساعت تخمیر میزان گروه‌های آمین آزاد به‌طور معناداری افزایش یافت. آن‌ها دلیل این امر را نیاز باکتری‌ها برای به‌دست آوردن نیتروژن از الیگوپپتیدها و اسیدهای آمینه از مسیر اصلی هیدرولیز پروتئین بیان کردند. علاوه بر این، *لاکتوباسیلوس کازئی* فعالیت پروتئولیتیک بالاتری را در زمان‌های ۳ و ۵ ساعت در مقایسه با *لاکتوباسیلوس جنسونی* نشان داد. این افزایش می‌تواند مربوط به فعال شدن دیپپتیدازها و تریپپتیدازها باشد. همچنین مشخص شده است که گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* از ظرفیت بالاتری برای هیدرولیز کردن پپتیدهای کوچک و تولید گروه‌های آمین آزاد برخوردار هستند (Pérez-Escalante *et al.*, 2018).

اثر تخمیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (براساس مهار رادیکال DPPH و ABTS) عصاره کینوا

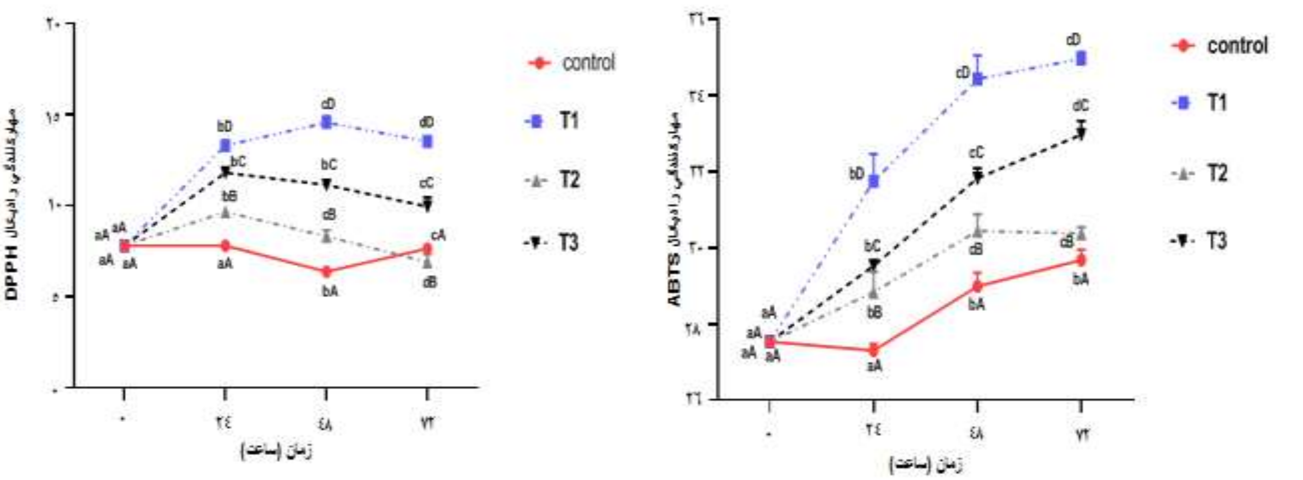
بعد از بررسی اثر تخمیر بر محتوای گروه‌های آمین آزاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تخمیر شده (براساس مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به‌صورت شکل زیر گزارش شد.

نتایج نشان دادند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهارکنندگی رادیکال DPPH) در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* تا ۴۸ ساعت اول فرآیند تخمیر افزایش یافت و از ۷/۸۰ درصد در زمان صفر به ۱۴/۵۶ درصد پس از ۴۸ ساعت تخمیر رسید. سپس با کاهش ۷ درصدی همراه بود. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH) در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تا ۲۴ ساعت اول تخمیر افزایش یافت و به ۶۵ /۹ درصد رسید سپس کاهش یافت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH) در نمونه تخمیر شده توسط ترکیبی از باکتری‌های فوق با نسبت ۵۰:۵۰ به ۱۱/۸۱ درصد در ۲۴ ساعت اول فرآیند تخمیر افزایش یافت سپس با ادامه فرآیند تخمیر از فعالیت آن کاسته شد.

براساس شکل ۵ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال آزاد ABTS در تمامی نمونه‌های تخمیر شده (توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت جداگانه و ترکیبی) افزایش یافت. این میزان به‌ترتیب در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب این دو باکتری به مقادیر ۳۴/۹۶، ۳۰/۳۶ و ۳۲/۹۷ درصد پس از ۷۲ ساعت تخمیر رسید. نتایج نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* توان پروتئولیتیک بالاتر، قابلیت بیشتری در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان دارند. محققین مختلف دلیل تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان را تغییرات pH بیان داشتند. از طرف دیگر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول تخمیر می‌تواند به‌دلیل آزادسازی آگلیکون ایزوفلاون‌ها از طریق عمل کاتالیزوری فعالیت β- گلوکوزیداز و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی میکروارگانیسم‌ها باشد (Wang *et al.*, 2006). تحقیقات پیشین میزان

اسیدلاکتیک تولید شده و رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها را عامل اصلی تفاوت در میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند تخمیر گزارش کردند. به‌عبارتی هرچه میزان اسیدلاکتیک تولید شده و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها بیشتر باشد، تجزیه دیواره سلولی بیشتر شده و در نهایت ترکیبات فنولی بیشتری آزاد می‌شوند در نتیجه سبب افزایش میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد میگردد. علاوه بر این مشخص شده است که تناسب بالایی بین فعالیت‌های پروتئولیتیک میکروارگانیسم‌ها و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مواد غذایی وجود دارد (Shobharani *et al.*, 2014). از طرف دیگر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال DPPH بعد از ۴۸ ساعت تخمیر را می‌توان به تجزیه توالی‌های آنتی‌اکسیدانی در طی فرآیند تخمیر نسبت داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها تحت تاثیر نوع اسید آمینه و توالی آن در ساختار پپتیدها می‌باشد. بطوری که میزان بالای اسیدهای آمینه هیدروفوب تاثیر به‌سزایی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد (Kim *et al.*, 2013). کرباسی و همکاران (۱۳۹۴) تولید نوشیدنی تخمیری بر پایه شیره خرما توسط باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها به مدت ۲۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تخمیر شدند سپس ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طی ۱۲ روز نگهداری بررسی کردند. نتایج نشان دادند. با افزایش زمان تخمیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها افزایش یافته است. آن‌ها دلیل این امر را اینگونه بیان کردند که در شرایط pH اسیدی به علت پلیمرایزسیون ترکیبات پلی‌فنولی و همچنین آنزیم‌های باکتری‌های اسید لاکتیک پپتیدهای کوچک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌گردد. نتایج ارائه شده در شکل ۵ نشان دادند که استفاده ترکیبی از دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۵۰:۵۰) نه تنها سبب افزایش فعالیت پروتئولیز نشد بلکه در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز موثر نبود.

نتایج نشان دادند که پپتیدهای تولید شده از عصاره کینوا فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS بالاتری نسبت به مهار رادیکال DPPH دارد که حاکی از ماهیت هیدروفیل بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدان تولیدی می‌باشد. محققین تفاوت در مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS را تفاوت در حلالیت و انتشار در محیط واکنش بیان داشتند. رادیکال‌های ABTS در محلول‌های آلی و آبی قابل حل هستند، اما رادیکال‌های DPPH فقط در محیط‌های آلی قابل حل می‌باشند (Afify *et al.*, 2018).

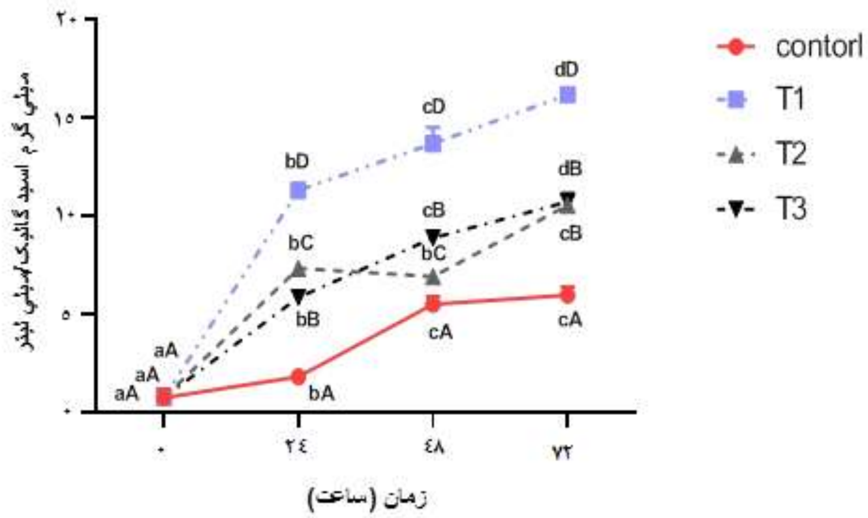


شکل ۵- مقایسه مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در نمونه‌های کینوا حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* (T1)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (T2) و *لاکتوباسیلوس روتری*+*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (T3) در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و مقایسه با نمونه کنترل (تخمیر نشده)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

اثر تخمیر بر میزان ترکیبات فنولی نمونه‌های تخمیر شده

ترکیبات فنولی یکی از ترکیبات مهم در گیاهان می‌باشد که قادر به حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشد لذا این ترکیبات به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانشان بسیار مورد توجه می‌باشند. برای اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی در نمونه‌ها مطابق فولین- سیوکالتیو، از منحنی استاندارد اسید گالیک در محدوده غلظت‌های ۱۰۰-صفر میلی‌گرم/ میلی‌لیتر استفاده شد. سپس میزان ترکیبات فنولی نمونه‌ها با روش فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد.



شکل ٦- مقایسه ترکیبات فنولی در نمونه‌های کینوا حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس روتری (T1)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T2) و لاکتوباسیلوس روتری+ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (T3) در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت و مقایسه با نمونه کنترل (تخمیر نشده)
حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، میزان ترکیبات فنولی در تمامی نمونه‌های تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب این دو باکتری با نسب ۵۰:۵۰ از همان ابتدای فرآیند تخمیر روند افزایشی داشت و بالاترین میزان خود بعد از ۷۲ ساعت تخمیر رسیدند. نتایج نشان دادند که میزان ترکیبات فنولی در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری* نسبت به سایر نمونه‌ها افزایش بیشتری داشت. محققین دلیل افزایش ترکیبات فنولی در طی فرآیند تخمیر را اینگونه بیان داشتند که تخمیر سبب هیدرولیز ترکیبات فنولی گلیکوزیل و ایجاد ترکیبات فنولی آزاد می‌شود. از طرفی آنزیم‌های حاصل از باکتری‌ها من جمله بتاگلوکوزیداز در این واکنش‌های پیچیده نقش به‌سزایی دارند (جوانمردی و همکاران، ۱۳۹۳). مطالعات مختلف نشان دادند که شرایط تخمیر، تاثیر بسزایی در تولید ترکیبات زیست فعال از جمله ترکیبات فنولی دارد و تغییرات pH را عامل اصلی افزایش ترکیبات فنولی در طی فرآیند تخمیر گزارش کردند. در واقع هرچه میزان pH به شرایط بهینه نزدیکتر باشد میزان ترکیبات فنولی در محصول نیز بیشتر است زیرا در شرایط pH بهینه، فعالیت میکروارگانیسم‌ها جهت آزادسازی آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی و به دنبال آن شکستن اتصال بین ترکیبات فنولی با قندها و یا گلیکوزیدها بیشتر است (Juan *et al.*, 2010). در تحقیقی که Apostolidis و همکاران (۲۰۰۷) انجام دادند اثر فرآیند تخمیر شیر و شیر سویا توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* را طی ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها نیز گزارش کردند که میزان ترکیبات فنولی در طی فرآیند تخمیر افزایش یافته است و دلیل این امر را اینگونه بیان داشتند که احتمالاً فرآیند تخمیر سبب تولید پپتیدهای کوچک و ترکیبات فنولی پلیمری از ترکیبات ساده فنولیک شده است. از طرف دیگر هر دو فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به رادیکال DPPH و مهار رادیکال ABTS در طول تخمیر افزایش یافته است، که نشان‌دهنده اثر مثبت ترکیبات فنولی می‌باشد (Apostolidis *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* رشد سریع‌تری داشته است و در مدت زمان کوتاه به بالاترین میزان رشد رسیده است. از نظر سایر فاکتورهای مورد بررسی باکتری‌ها عملکردهای متفاوتی را از خود نشان دادند. میزان pH در تمامی نمونه‌های تخمیر شده (توسط *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ترکیب این دو باکتری) در طی فرآیند تخمیر کاهش یافته و از ۵ به ۴ رسیده است. بیشترین کاهش در میزان pH مربوط به نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. نتایج نشان دادند که میزان اسیدیته در نمونه تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به سایر نمونه‌ها افزایش داشته و از ۰/۲۷ به ۱/۱۳ درصد رسید. میزان پروتئین محلول و درجه هیدرولیز در نمونه‌های تخمیر شده توسط تمام گونه‌ها افزایش یافت. اما بیشترین افزایش

مربوط به نمونه تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بود به‌طوری که میزان پروتئین محلول از ۰/۷۲ به ۰/۸۸ میلی‌گرم پروتئین/ میلی‌لیتر رسیده است و میزان درجه هیدرولیز از ۲۰/۲۸ به ۵۸/۱۴ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین در طی ۷۲ ساعت تخمیر توسط این باکتری رسیده است. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در تمامی نمونه‌های تخمیری افزایش یافته است. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب در نمونه‌های تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس روتری*، ترکیب دو باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (با نسبت ۵۰:۵۰) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده شد. نتایج نشان دادند که تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس روتری* بیشترین تاثیر را در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی و آزادسازی ترکیبات فنولی دارد. نتایج این تحقیق، کارایی روش‌های تخمیری را در بهبود خواص سلامت بخشی عصاره کینوا تایید می‌کند و باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* باکتری موثرتری در تخمیر و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. استفاده همزمان از دو باکتری باعث افزایش شدت تخمیر و بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با باکتری‌های تکی نشد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس و آزمایشگاه گیاهان دارویی جهت تامین امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقای دکتر مهدی ملک‌پور به خاطر کمک‌های ارزشمندشان در انجام این پایان نامه قدردانی می‌گردد.

منابع

Apostolidis, E., Kwon, Y.-I., Ghaedian, R., Shetty, K., 2007. Fermentation of milk and soymilk by Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus acidophilus enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food biotechnology* 21, 217-236.

Abugoch, L., Castro, E., Tapia, C., Añón, M.C., Gajardo, P., Villarroel, A., 2009. Stability of quinoa flour proteins (Chenopodium quinoa Willd.) during storage. *International journal of food science & technology* 44, 2013-2020.

Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., 2010. Determination of boza's organic acid composition as it is affected by raw material and fermentation. *International Journal of Food Properties* 13, 648-656.

Ankolekar, C., Pinto, M., Greene, D., Shetty, K., 2012. In vitro bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of Lactobacillus acidophilus fermented pear juice. *Innovative food science & emerging technologies* 13, 221-230.

Afify, A.E.-M.M., El Baroty, G.S., El Baz, F.K., El Baky, H.H.A., Murad, S.A., 2018. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16, 399-408.

Bagheri F, Mirdamadi S, Mirzaei M, Safavid M. 1398. Production of beneficial fermented milk by lactobacilli isolated from traditional Iranian dairy products. *Quarterly Journal of New Food Technologies*, 2: 255-243.

Bianchi, F., Rossi, E., Gomes, R., Sivieri, K., 2015. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (Chenopodium quinoa Willd) and soy. *Food Science and Technology International* 21, 403-415.

Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., Chou, S.-T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by Bacillus subtilis IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2454-2458.

Chen, G.-W., Tsai, J.-S., Pan, B.S., 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal* 17, 641-647.

Ceballos-González, C., Bolívar-Monsalve, J., Ramírez-Toro, C., Bolívar, G.A., 2018. Effect of lactic acid fermentation on quinoa dough to prepare gluten-free breads with high nutritional and sensory quality. *Journal of Food Processing and Preservation* 42, e13551.

Dallagnol, A.M., Pescuma, M., De Valdez, G.F., Rollán, G., 2013. Fermentation of quinoa and wheat slurries by Lactobacillus plantarum CRL 778: proteolytic activity. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 3129-3140.

Ebrahimi Jam S., Zarrin Qalami S., Ganjloo A. 1398. Production of gluten-free fermented beverage based on quinoa by probiotic bacteria, *Journal of Food Industry Research*, 1: 42-27.

Fitznar, H.P., Lobbes, J.M., Kattner, G., 1999. Determination of enantiomeric amino acids with high-performance liquid chromatography and pre-column derivatisation with o-phthaldialdehyde and N-isobutyrylcysteine in seawater and fossil samples (mollusks). *Journal of Chromatography* A 832, 123-132.

Griffiths, M.W., Tellez, A.M., 2013. Lactobacillus helveticus: the proteolytic system. Frontiers in Microbiology 4, 30.

Izadi A., Zarrin Qalami S., Ganjloo A. 1396. Production of useful fermented beverage based on rice containing natural sweetener of honey. Journal of Food Science and Technology, Volume 62, Number 14, pp. 201-214.

Juanmardi A, Labafi M, Khodanian F, Salehi A. 1395. Feasibility Study of Fermented Beverage Extraction from Red Beet Extract by Lactic Acid Bacteria, *Journal of Food Science and Technology* 56: 9-1.

Juan, M.-Y., Chou, C.-C., 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with Bacillus subtilis BCRC 14715. *Food microbiology* 27, 586-591.

Karbasi M., Mousavi M., Yarmand M. S. 1394. Production and packaging of fermented beverage from date juice containing Lactobacillus rhamnosus, *Journal of Food Processing and Storage*, 2: 38-17.

Khalili F, Erjaei Z. 1397. Effect of sourdough fermentation containing Lactobacillus plantarum and Lactobacillus ruteri on sensory, physicochemical and stale properties of barley bread. *Journal of Food Science and Nutrition*, 3: 42 -33.

Katina, K., Liukkonen, K.-H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.-M., Lampi, A.-M., Pihlava, J.-M., Poutanen, K., 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science* 46, 348-355.

Kim, S.-K., 2013. Marine proteins and peptides: biological activities and applications. John Wiley & Sons.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951a. Total protein estimation by Lowry's method. J. Biol. Chem 193, 265.

Moayedi A, NikPayam M, Khomeiri M, Aghdaei S. 1396. Antibacterial activity of hydrolyzed proteins obtained from enzymatic digestion of soy protein isolates on some food index bacteria. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, 3: 31-22.

Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., Yamamoto, N., 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition* 94, 84-91.

Magala, M., Kohajdova, Z., Karovičová, J., Greifova, M., Hojerova, J., 2015. Application of lactic acid bacteria for production of fermented beverages based on rice flour. Czech *Journal of Food Sciences* 33, 458-463.

Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Aminlari, M., 2018. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from Kluyveromyces marxianus protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis* 26, 696-705.

National Standard No. 11117. 1989. Fermented Milks - Kefir Drink - Characteristics and Test Methods.

Pérez-Escalante, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Añorve-Morga, J., González-Olivares, L.G., 2018. Antithrombotic activity of milk protein hydrolysates by lactic acid bacteria isolated from commercial fermented milks. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 61.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26, 1231-1237.

Rathore, S., Salmerón, I., Pandiella, S.S., 2012. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology* 30, 239-244.

Sade Miri S, Lari H, Arab A. 1394. Measurement of total anthocyanin phenol and antioxidant activity in pericarb of pumpkin fruit of Qazvini cultivar Cucurbita pepo L.var squash. National Conference on New Topics in Agriculture, 3: 275-267.

Souri A, Mirzaei M, Mirdamadi S. 1397. Evaluation of the antioxidant effect of green tea leaf extract on the survival of probiotic bacteria in watermelon juice. *Journal of Food Science and Technology*, 85: 86-73.

Sharma, N., Singh, N., Singh, O., Pandey, V., Verma, P., 2011. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. Asian-*Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 479-484.

Shobharani, P., Nanishankar, V., Halami, P., Sachindra, N., 2014. Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented Sargassum sp. *International journal of biological macromolecules* 65, 542-548.

Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A.A., Ghazali, H.M., 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology advances* 33, 80-116.

Sezgin, A.C., Sanlier, N., 2019. A new generation plant for the conventional cuisine: quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Trends in Food Science & Technology*.

Wright, K., Pike, O., Fairbanks, D., Huber, C., 2002. Composition of Atriplex hortensis, sweet and bitter Chenopodium quinoa seeds. *Journal of Food Science* 67, 1383-1385.

Wang, Y.-C., Yu, R.-C., Chou, C.-C., 2006. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology* 23, 128-135.

Wang, X., Yu, H., Xing, R., Chen, X., Liu, S., Li, P., 2017. Optimization of the extraction and stability of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) protein. *BioMed research international* 2017.

Zannini, E., Jeske, S., Lynch, K.M., Arendt, E.K., 2018. Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer Weissella cibaria MG1. *International journal of food microbiology* 268, 19-26.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 747-759

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۷۵۹ -۷۴۷

Effect of fermentation by *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus* on antioxidant activity of quinoa extract

R. Tahmasbi[1], M. Mirzaei[2*], M. R. Khani[2]

Received: 2020.08.26
Accepted: 2020.10.21

Introduction: Fermented foods, probiotic, prebiotics, and symbiotic, are among the most important groups of functional food that have attracted the attention of researchers during the last years. Proteolytic activity of lactic acid bacteria can lead to the production of peptides in the fermented product. The produced peptides can exhibit different biological activities such as antioxidant, antihypertensive, etc. that are influenced by the type of protein source, type of bacteria, time and conditions of fermentation process. Fermentation of various cereals such as quinoa seeds with high sugar and protein content by lactic acid bacteria can lead to the production of antioxidant peptides and improving their nutritional properties.

Materials and Methods: In this study, the role of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus* and the combination of two bacteria on the progress of fermentation and antioxidant activity of quinoa extract was investigated. The fermentation process was started by separate and simultaneous inoculating of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus* and continued for 72 hours at 37° C. Sampling was performed every 24 hours of fermentation and samples were kept at -20° C for further analysis. The parameters such as pH, acidity, amount of soluble protein, degree of hydrolysis, amount of phenolic compounds and DPPH and ABTS radical scavenging activity were determined.

Results and Discussion: *Lactobacillus acidophilus* showed higher acidification capacity than *Lactobacillus reuteri.* The amount of acidity in the sample fermented by *Lactobacillus acidophilus* increased from 0.27 to 1.13 % after 72 hours, while this amount was measured as 0.80 % for sample fermented by *Lactobacillus reuteri*. The amount of soluble protein and the degree of hydrolysis increased in samples fermented by both species. However, the largest increase was related to the sample fermented by *Lactobacillus reuteri,* so that the amount of soluble protein increased from 0.72 to 0.88 mg / ml and the value of free amino groups increased from 20.28 to 58.14 µM leucin/ mg protein during 72 hours of fermentation. The DPPH and ABTS radical scavenging activity increased in all fermented samples. The highest antioxidant activity was observed in samples fermented by *Lactobacillus reuteri*, followed by a combination of *two bacteria* (50:50) and *Lactobacillus acidophilus*. The amounts of phenolic compounds increased in all fermented samples. However, the highest increase was related to the sample fermented by *Lactobacillus reuteri,* so that it increased from 0/73 to 16.21 mg Gallic acid / ml after 72 hours of fermentation. Therefore, the results showed that despite the higher acidifying power of *Lactobacillus acidophilus* in quinoa extract, but *Lactobacillus reuteri* exhibited higher proteolytic activity, more ability to produce antioxidant peptides and also release phenolic compounds during the fermentation process.Simultaneous use of the two bacteria did not intensify the proteolytic activity and antioxidant activity of peptides, and the greatest increase in acidity, proteolysis, and antioxidant activity occurred in the first 24 hours of fermentation. Fermented extracts showed higher ABTS radical inhibitory activity than DPPH radical inhibition, indicating the hydrophilic nature of most produced antioxidant compounds. The highest levels of antioxidant activity were observed in samples fermented by *Lactobacillus reuteri,* a combination of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus* (50:50) *and Lactobacillus acidophilus,* respectively. The results showed that fermentation by *Lactobacillus reutri* has the greatest effect on the production of antioxidant peptides and the release of phenolic compounds. The results of this study confirm the effectiveness of fermentation methods on improving the healing properties of quinoa extract and *Lactobacillus reuteri* was a more effective bacterium in fermentation and production of antioxidant peptides compared to *Lactobacillus acidophilus*. Simultaneous use of two bacteria did not increase the intensity of fermentation and did not improve the antioxidant activity compared to single use of each bacteria. Finally, the results of this study showed that fermentation of quinoa extract improves its antioxidant properties and has the potential to be used as a fermented beverage.

Keywords: Antioxidant activity, Fermentation, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus,* Quinoa extract.

1 and 2. M.Sc and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
(* Corresponding author; Email: mahtam86@gmail.com)